

УДК 577.1+539.25+53.087/.088

ФЕНОМЕНОЛОГИЧЕСКИЕ И ФРАКТАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ В АСМ-ИССЛЕДОВАНИЯХ МИКРОГЕОМЕТРИИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН

*О.А. Коновалова, М.Э. Сибгатуллин, А.Н. Монтач,
Н.В. Калачева, Д.З. Галимуллин, М.Х. Салахов*

Аннотация

Для количественной оценки структурных и морфологических изменений поверхности клеток, вступивших на путь апоптоза, рассчитаны феноменологические (S_y , S_a , S_q , энтропия) и фрактальные характеристики (характеристическая фрактальная размерность, размерность Ричардсона и показатель Херста). Их анализ показал, что с помощью феноменологических характеристик можно установить четкую тенденцию в изменении микрогеометрии клеточной мембраны, тогда как фрактальные характеристики позволяют получить дополнительную информацию об упорядоченности структуры поверхности мембран клеток. Установлено, что с помощью феноменологических и особенно фрактальных параметров можно выявить нарушения структуры клеточных мембран, которые визуально не определяются.

Ключевые слова: феноменологические и фрактальные характеристики, структура, клеточная поверхность.

Введение

Существующие на сегодняшний день методы описания морфологических особенностей наноразмерных структур имеют качественный характер и нередко являются визуальными. В связи с масштабным переходом науки и технологии к манипуляции объектами наноразмера и усложнением методов анализа результатов проблема количественного определения степени упорядоченности систем таких объектов является в последние годы очень актуальной.

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ), в особенности атомно-силовая микроскопия (АСМ), позволяет получать в нанометровом диапазоне трехмерные изображения поверхности образцов с разным типом проводимости, действуя при этом на воздухе, в жидкости и в вакууме. Последующая математическая обработка данных дает возможность глубокого анализа различных характеристик поверхности и открывает перспективу для широкого использования АСМ при изучении локальной структуры поверхности разнообразных объектов в электронике, кристаллографии, химии, биологии, медицине и т. п.

В настоящей работе на примере макрофагов, вступивших на путь апоптоза, проведена оценка эффективности применения некоторых феноменологических и фрактальных характеристик к АСМ-изображениям биологических объектов с целью получения дополнительной информации о структуре их поверхностей. Особый интерес представляют случаи, когда изменения микрогеометрии клеточных мембран визуально не фиксируются. Тогда определение количественных параметров состояния клеточной поверхности, а именно феноменологических и фрактальных характеристик, поможет прогнозировать путь развития клетки.

1. Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования выбраны перитонеальные макрофаги (контрольные образцы) и макрофаги, обработанные мономером (400 мкг/мл) и димером (25 мкг/мл) РНКазы *Bacillus intermedius* (РНКазы *B. intermedius*) (опытные образцы). Димерную форму РНКазы получали описанным в работе [1] способом. Образцы для сканирования готовили по методике, приведенной в [2].

Визуализацию поверхностных слоев макрофага проводили на воздухе при комнатной температуре в полуконтактном режиме на АСМ Solver P47H (ЗАО «НТ-МДТ»), сканер 50 мкм. Были использованы стандартные кремниевые кантилеверы NSG11 (ЗАО «НТ-МДТ»), радиус кривизны острия которых был менее 10 нм.

Для описания и детализации структуры поверхности применялись феноменологические характеристики [3], которые определяют наиболее общие свойства, отражающие состояние рельефа всех видов поверхности, в том числе и биологических объектов. Для описания микрогеометрии поверхности снимали серию изображений с одинаковыми размерами (5×5 мкм) с различных участков поверхности и определяли параметры шероховатости по следующим формулам.

а) Среднеарифметическая шероховатость поверхности, которая определяет центр симметрии:

$$S_a = \left(\frac{1}{N^2} \right) \sum_{i,j=1}^N |z(i,j) - z_{\text{mean}}|, \quad (1)$$

где $z(i,j)$ – значение высоты рельефа в точке с координатами (i,j) , измеренное с помощью АСМ, N – количество точек в строке сканирования, $z_{\text{mean}} = 1/N^2 \sum_{i,j=1}^N z(i,j)$ – среднее значение высоты рельефа на изображении.

б) Среднеквадратичная шероховатость поверхности, которая определяет дисперсию случайной величины и характеризует рассеяние отдельных ее значений от центра распределения:

$$S_q = \left\{ \frac{1}{N^2} \sum_{i,j=1}^N (z(i,j) - z_{\text{mean}})^2 \right\}^{1/2}. \quad (2)$$

в) Размах высот, который определяет разницу между наибольшим (z_{max}) и наименьшим (z_{min}) значениями высот рельефа на изображении:

$$S_y = z_{\text{max}} - z_{\text{min}}.$$

Для количественной оценки степени упорядоченности наноразмерных структур применялись 4 фрактальные характеристики: характеристическая фрактальная размерность, размерность Ричардсона, показатель Херста, относительная дисперсия [4]. Был проведен расчет для каждого типа клеток: контроль, макрофаги + мономер РНКазы *B. intermedius*, макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius*. В качестве примера на поверхности контрольной клетки (рис. 1, а) показано характерное место, выбранное для математической обработки. Для подобных областей построчно рассчитывались значения фрактальных характеристик.

2. Эксперимент

Ранее нами было впервые показано, что мономер и димер РНКазы *B. intermedius* вызывают апоптоз перитонеальных макрофагов *in vitro*, а метод атомно-силовой микроскопии позволяет исследовать различные стадии апоптоза [5].

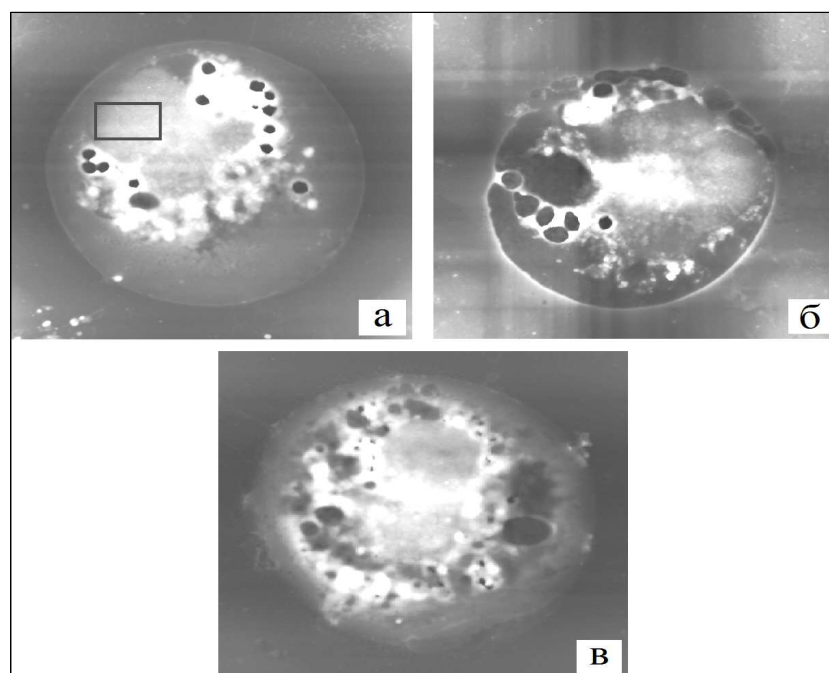


Рис. 1. АСМ-изображения макрофагов, размер кадра 30×30 мкм: а) контроль с указанием выбранной для обработки области; б) макрофаги + мономер РНКазы *B. intermedius* (400 мкг/мл); в) макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius* (25 мкг/мл)

На рис. 1 представлены АСМ-изображения макрофагов, которые отражают морфологические изменения поверхности клеток с учетом расположения внутриклеточных органелл и их перераспределения в процессе апоптоза. По сравнению с контрольными образцами у макрофагов, обработанных мономером и димером РНКазы *B. intermedius*, можно отметить характерные для апоптоза морфологические изменения клетки (рис.1, б, в): высвобождение содержимого клетки (блеbbing), которое приводит к уменьшению объема цитоплазмы, инвагинации ядерной мембраны, фрагментации ядра. Однако на поверхности интактных клеток и клеток, обработанных препаратами РНКаз, имеются участки без четких различий в структуре и морфологии, в том числе участки в области ядра. Для количественной оценки структурных и морфологических изменений поверхности этих участков были рассчитаны феноменологические и фрактальные характеристики.

При анализе феноменологических характеристик (S_y , S_a , S_q , энтропия) наблюдается четкая тенденция последовательного увеличения значений всех параметров у клеток, обработанных мономером и димером, по сравнению с контрольными образцами макрофагов (табл. 1). Однако параметры шероховатости, определяемые по формулам (1), (2), не содержат информации о равномерности и упорядоченности рельефа поверхности.

Микрогеометрия поверхности клеток является динамической системой. Исследование динамической системы предполагает изучение ее свойств, которые определяются некоторыми инвариантами (например, энтропией и т. д.). Поэтому в этом случае использование классических геометрических параметров шероховатости является недостаточным. Более того, геометрические параметры не отображают такое важное свойство шероховатости динамической системы, как эволюция.

Табл. 1

Феноменологические характеристики поверхности макрофагов до и после взаимодействия с мономером и димером РНКазы *B. intermedius*

Параметр	Контроль	Макрофаги + мономер РНКазы <i>B. intermedius</i>	Макрофаги + димер РНКазы <i>B. intermedius</i>
S_y , нм	142.1 ± 33.9	172.3 ± 38.5	218.5 ± 65.1
S_a , нм	19.5 ± 3.9	23.0 ± 6.5	32.7 ± 19.6
S_q , нм	23.8 ± 4.7	28.4 ± 7.1	39.3 ± 9.4
Энтропия	10.1 ± 0.3	10.3 ± 0.3	10.5 ± 0.4

Таким образом, необходимы новые подходы в оценке микрогеометрии поверхности, и одним из таких подходов может быть использование теории фракталов. Применение теории фракталов позволит внести новые показатели для оценки шероховатости, прогнозировать изменения микрогеометрии клеточной поверхности в процессе их формирования.

Фрактальные измерения в отличие от феноменологических имеют своей целью количественно оценить поверхность с точки зрения упорядоченности, определить меру хаотичности структуры. Изменение показателя энтропии в табл. 1 отчасти дает возможность судить также о степени хаотичности в структуре мембраны макрофагов, однако только в самом общем виде.

Был проведен сравнительный анализ значений вышеупомянутых 4 фрактальных характеристик, рассчитанных по данным АСМ-изображений поверхностей макрофагов для 3 групп клеток: контрольная группа, макрофаги + мономер РНКазы *B. intermedius* и макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius* (рис. 2).

Первая из характеристик – характеристическая фрактальная размерность (CFD), дает оценку степени, с которой траектория в произвольном пространстве отличается от прямолинейного пути. CFD больше или равна единице; равенство единице соответствует прямолинейному пути. В данном случае роль одномерного сигнала выполняет строка из матрицы АСМ-изображения. Приведенные на рис. 2 данные позволяют сделать вывод, что группа контрольных клеток имеет наиболее упорядоченную поверхность, так как соответствующее ей значение CFD ближе всех к 1, далее идет группа клеток макрофаги + мономер РНКазы *B. intermedius* и самая неровная поверхность у группы клеток макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius* (рис. 2, А).

Вторая характеристика – размерность Ричардсона (D_R), которая подобно CFD дает понятие о степени отклонения сигнала от прямой. Ее значения также показывают большую упорядоченность у поверхностей группы контрольных клеток и хаотичность у группы клеток макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius*. Нужно заметить, что размерность Ричардсона оказывается более чувствительной к изменениям в структуре поверхности, чем CFD (рис. 2, Б).

Показатель Херста (H) указывает на степень персистентности или антиперсистентности и принимает значения от 0 до 1. Чем он ближе к 1, тем более персистентное поведение у сигнала. В данном случае показатель Херста ближе всего к 1 для контрольных клеток. Следовательно, эта группа поверхностей имеет наибольшую упорядоченность и содержит меньше всего высокочастотных шумовых компонент. Чуть более хаотичными являются поверхности группы клеток макрофаги + мономер РНКазы *B. intermedius*, а еще более – группы макрофаги + димер РНКазы *B. intermedius* (рис. 2, В).

Последняя характеристика – относительная дисперсия (D_{RD}) – говорит о величине разброса значений сигнала в зависимости от длины набора данных, и наименьший разброс наблюдается у контрольной группы клеток. Однако надо

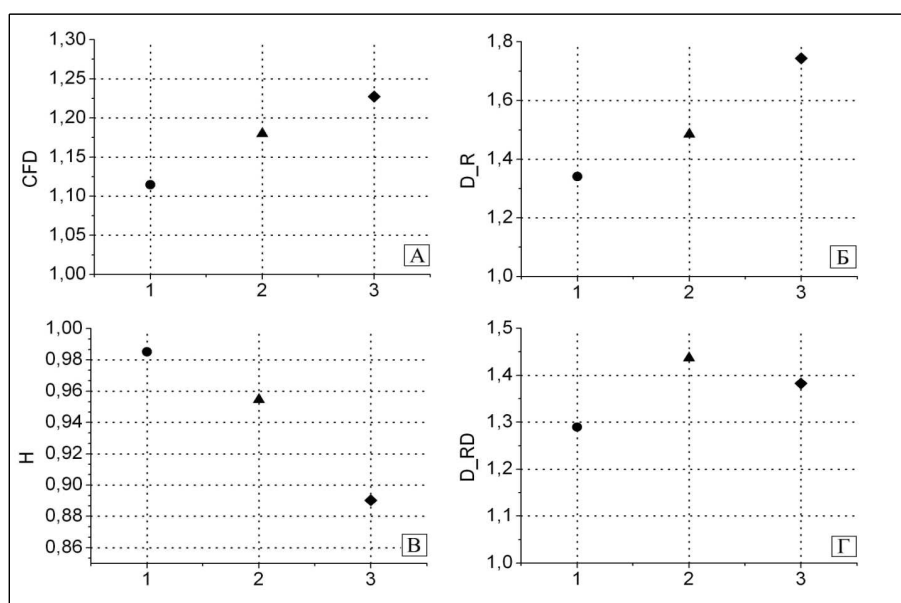


Рис. 2. Фрактальные характеристики: А) характеристическая фрактальная размерность CFD; Б) размерность Ричардсона D_R; В) показатель Херста H; Г) относительная дисперсия D_RD. Обозначения: ● – группа контрольных клеток, ▲ – макрофаги + мономер РНКазы, ◆ – макрофаги + димер РНКазы

заметить, что ее значения позволяют лишь отделить контрольную группу клеток от остальных (рис. 2, Г).

Таким образом, все фрактальные характеристики указывают на то, что самая упорядоченная поверхность наблюдается у группы контрольных клеток, далее следует группа клеток макрофаги+мономер РНКазы *B. intermedius* и самой хаотичной оказывается группа клеток макрофаги+димер РНКазы *B. intermedius*.

Заключение

Для количественной оценки структурных и морфологических изменений поверхности макрофагов рассчитаны феноменологические (S_y , S_a , S_q , энтропия) и фрактальные характеристики (характеристическая фрактальная размерность, размерность Ричардсона и показатель Херста). Установлено, что с помощью феноменологических характеристик можно показать четкую тенденцию в изменении микрогеометрии клеточной мембраны, тогда как фрактальные характеристики позволяют получить дополнительную информацию об упорядоченности структуры поверхности мембран клеток. Анализ значений этих характеристик показал следующие результаты: наиболее упорядоченная поверхность принадлежит контрольным клеткам. Поверхности макрофагов, взаимодействующих с мономером РНКазы *B. intermedius*, имеют менее упорядоченную структуру, в них присутствует больше высокочастотных составляющих. Структура поверхностей макрофагов, обработанных димером РНКазы *B. intermedius*, является самой хаотичной. Четвертая характеристика (относительная дисперсия) не выявила отличий в структурах мембран клеток, обработанных мономером и димером РНКазы.

Полученные результаты подтвердили структурные и морфологические изменения в макрофагах после их инкубации с мономером и димером РНКазы *B. intermedius*, характерные для апоптоза. Эти нарушения так же, как и визуальные,

выражены сильнее у клеток после их взаимодействия с димерной формой РНКазы *B. intermedius*.

Рассмотренные феноменологические и фрактальные характеристики представляют большой интерес для изучения структуры различных поверхностей, в том числе биологических мембран, поскольку с их помощью можно выявить нарушения структуры клеточных мембран, которые визуальным образом не фиксируются.

Summary

O.A. Konovalova, M.E. Sibgatullin, A.N. Montach, N.V. Kalacheva, D.Z. Galimullin, M.Kh. Salakhov. Phenomenological and Fractal Characteristics of Microgeometry of Cellular Membranes in AFM-Images.

Phenomenological (S_y , S_a , S_q , entropy) and fractal characteristics (characteristic fractal dimension, the Richardson dimension and the Hurst exponent) were calculated to quantitatively estimate the structural and morphological changes of the surface of the cells undergoing apoptosis. Their analysis showed that it is possible to establish an accurate tendency in the change of the microgeometry of a cellular membrane by means of phenomenological characteristics. Whereas fractal characteristics allow one to obtain the additional information about the orderliness of the structure of membrane surface. It was established that phenomenological and especially fractal parameters make it possible to reveal structural infringements of cellular membranes, which cannot be visually defined.

Key words: phenomenological and fractal characteristics, structure, cell surface.

Литература

1. Калачева Н.В., Куриненко Б.М. Влияние рибонуклеаз и их модифицированных производных на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы // Биомед. химия. – 2005. – Т. 51, № 3. – С. 303–310.
2. Калачева Н.В., Коновалова О.А., Налимов Д.С., Салахов М.Х., Ильинская О.Н., Куриненко Б.М. Ингибирование фагоцитарной функции макрофагов *in vitro* димерной формой рибонуклеазы *Bacillus intermedius* // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 6. – С. 487–491.
3. Арутюнов П.А., Толстихина А.Л. Сканирующая зондовая микроскопия (туннельная и силовая) в задачах метрологии и нанoeлектроники // Микроэлектроника. – 1997. – Т. 26, № 6. – С. 426–439.
4. Rapp P.E., Watanabe T.A.A., Faure P., Cellucci C.J. Nonlinear signal classification // Int. J. Bifurcat. Chaos. – 2002. – V. 12, No 6. – P. 1273–1293.
5. Коновалова О.А., Ефимова И.Р., Калачева Н.В. Исследование поверхности перитонеальных макрофагов после их взаимодействия с мономером и димером РНКазы *B. intermedius* методом АСМ // Тез. докл. третьей междунар. конф. «Современные достижения бионаноскопии». – М., 2009. – С. 34.

Поступила в редакцию
31.12.09

Коновалова Ольга Анатольевна – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры оптики и нанофотоники Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: olga.konovalova@bk.ru

Сибгатуллин Мансур Эмерович – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры оптики и нанофотоники Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: sibmans@rambler.ru

Монтач Анна Николаевна – студент кафедры оптики и нанопотоники Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *mona13@mail.ru*

Калачева Наталия Васильевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории инженерной энзимологии биологического факультета Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *nvkalacheva@yandex.ru*

Галимуллин Дамир Зиннурович – кандидат физико-математических наук, ассистент кафедры оптики и нанопотоники Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *galimullin_d.z@mail.ru*

Салахов Мяззюм Хамимуллович – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой оптики и нанопотоники Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: *Myakzyum.Salakhov@ksu.ru*